

PCT/JP00/06172

JP00/6172
ETU
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

11.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月 8日

REC'D 27 OCT 2000

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第254463号

出願人
Applicant(s):

東レ株式会社

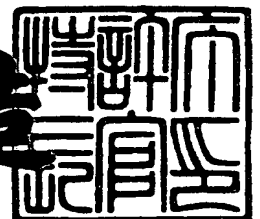
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2000-3083148

【書類名】 特許願

【整理番号】 36C01190-A

【提出日】 平成11年 9月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61M 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県大津市園山 1 丁目 1 番 1 号 東レ株式会社滋賀事業場内

 【氏名】 清水 晋治

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県大津市園山 1 丁目 1 番 1 号 東レ株式会社滋賀事業場内

 【氏名】 久保田 昌裕

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 株式会社東レリサーチセンター内

 【氏名】 秋山 英雄

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 株式会社東レリサーチセンター内

 【氏名】 臼井 美奈

【特許出願人】

 【識別番号】 000003159

 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号

 【氏名又は名称】 東レ株式会社

 【代表者】 平井 克彦

 【電話番号】 03-3245-5648

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005186

【納付金額】

21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖尿病合併症因子吸着体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチド、若しくは、抗体が結合できる糖尿病合併症因子を除去できる物質を水不溶性担体に固定してなる糖尿病合併症因子吸着体。

GAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAQNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWKLNTGRTEAWKVLSPQGGGPW
DSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCRAMNRNGKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELTAGVPNKVGTC
VSEGSYPAGTLSWHLDGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPETGLFTLQSELMVTPARGGDPRPTFSCSFSPGLPR
HRLRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSPQIHWMKDGVPLPLPPSPVLIL
PEIGPQDQGTYSVATHSSHGPPQESRAVSISIIIEPGEEGPTAGSVGGSGGLTLALALGILGGLGTAALLIGV
ILWQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQSEEPEAGESSTGGP

(但し、上記配列はN末端からのものであり、アミノ酸は一文字記載のアルファベットで表した。)

【請求項 2】 該受容体アミノ酸配列を 7 % 以上有していることを特徴とする請求項 1 記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 3】 該受容体アミノ酸配列を 4 0 % 以上有していることを特徴とする請求項 1 記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 4】 該受容体アミノ酸配列を 8 4 % 以上有していることを特徴とする請求項 1 記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の該受容体アミノ酸配列の任意の場所に天然アミノ酸で構成される人工配列を 1 つ以上挿入させたことを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 6】 天然アミノ酸で構成される該人工配列の挿入箇所が該受容体アミノ酸配列の末端側にあることを特徴とする請求項 5 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 7】 天然アミノ酸で構成される該人工配列の挿入箇所が該受容体アミノ酸配列の C 末端側に存在することを特徴とする請求項 5 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 8】天然アミノ酸で構成される該人工配列の全アミノ酸数が 1 つ以上であることを特徴とする請求項 5 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 9】天然アミノ酸で構成される該人工配列の全アミノ酸数が 6 つ以上であることを特徴とする請求項 5 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 10】天然アミノ酸で構成される該人工配列が His-Tag であることを特徴とする請求項 5 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 11】該抗体が生体物質由来の反応性カルボニル基による非酵素的な修飾が関わって生成されるエピトープを認識していることを特徴とする請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 12】該エピトープがインビボとインビトロの双方で生成可能な構造であることを特徴とする請求項 11 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 13】該エピトープが健常者と比べて糖尿病患者の体液中で一般的に多く検出されることを特徴とする請求項 11 または請求項 12 に記載の糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 14】糖尿病合併症因子と吸着できる請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の受容体若しくは抗体の何れか或いは双方を化学結合或いは物理結合により水不溶性担体に結合していることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 15】請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載の水不溶性担体が多糖体或いはビニル芳香族化合物であることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

【請求項 16】請求項 1 ～ 15 のいずれかに記載の糖尿病合併症因子吸着体或いは充填される容器内に被処理液を接触させることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法。

【請求項 17】請求項 16 に記載の被処理液が体液由来であることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は体液に含有される糖尿病合併症因子を除去するための吸着体、それを用いた糖尿病合併症因子除去方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、生活習慣病と言われる病気が顕著に増加して問題視されている。生活習慣病の中には、糖尿病や高脂血症などが原因で動脈硬化に代表される様々な血管病変を引き起こす疾患が含まれ、患者の予後を大きく左右する 경우가少なくない。特に糖尿病に至っては、罹患期間に依存して腎糸球体に病理学的変化が出現し、さらに悪化すると腎不全を伴い、透析を施行しなければならなくなる。透析導入患者の原疾患を見ると、1998年末にはこれまで主原因であった慢性糸球体腎炎を追い抜き、糖尿病性腎症が主原因となり、今後も増加する透析患者の数を後押しするのは確実である。しかし、その詳細な発症機序については不明で、現在も医学の大きな問題である。

【0003】

近年、これらの血管病変を発症する原因として、AGE (advanced glycation endproducts) に代表される各種変性物質に注目が集まっている。AGEとは、主に糖尿病性合併症の原因物質と考えられているものであり、血液中に存在するブドウ糖に代表される還元糖、その代謝産物や反応産物とタンパク質や脂質などの低分子が酵素の関与なしに結合する前進性糖化反応 (advanced glycation) の産物である。化学反応の面で見ると、反応側のカルボニル基と非反応側のアミノ酸の塩基性官能基などに代表される求核性反応基との反応といえる。そのために、これら前進性糖化反応をはじめとする各種変性反応を総じてカルボニルストレスとも呼ぶようになった(腎と透析、47巻別冊、196頁、1999年)。また最近では、このカルボニルストレスに活性酸素やヒドロキシラジカルに代表されるラジカル体などによる生体中で生成される酸化反応が複雑に影響してカルボニルストレス産物が形成されることがわかってきた(臨床透析、14巻、4号、413頁、1998年)。

【0004】

AGEに代表されるカルボニルストレス産物が主に糖尿病性合併症の原因物質と考えられている説自体は最近の説ではなく、(Annals of Internal Medicine、101巻、527頁、1984年)や(The New England Journal of Medicine、

325巻、836頁、1991年)などに記述されている。また、透析患者など排泄機能に障害のある場合にもカルボニルストレス産物が蓄積する傾向にあることが知られている。

【0005】

当時は、還元糖等とタンパク質等の非酵素的反応体であるカルボニルストレス産物について、蛍光性、褐色性、架橋性、脱水、酸化、縮合、転移など様々な特徴が発見されたが、どれもカルボニルストレス産物が持つ病因性を直接説明できるものではなかった。カルボニルストレス産物の一つであるAGEの評価方法についても、以前はその特徴の一つである蛍光特性で血液中の測定を試みている例がよくあり、特開平6-312134号公報では、ヒト血漿中のAGEを(The New England Journal of Medicine、325巻、836頁、1991年)の838頁に従い、励起波長390nm、蛍光波長450nmで測定を試みている。しかし、蛍光測定は試験管内の前進性糖化反応の確認には用いられるが、血液中では夾雑物や薬剤の影響も多くあることと、また、ペントシジンなど励起波長335nm、蛍光波長385nmといった異なる蛍光特性のものも発見されるなど(Journal of the American Society of Nephrology、7巻、8号、1198頁、1996年)、上記蛍光特性を持つAGEはほんの一部に過ぎないことが分かりました。現在、ヒト血漿中のAGEを励起波長390nm、蛍光波長450nmで単純に測定することは、信頼性のある測定法ではないと認識されている。以来、蛍光特性による評価も測定手順に分子篩や化学処理を施したり、蛍光がどのAGE構造の蛍光を反映するかを考慮して評価するようになった。また、特異的な免疫学的測定方法で測定を試みる動きもある。これまで同定されたAGE構造はCML(カルボキシメチルリジン)、CEL(カルボキシエチルリジン)、ペントシジン、ピラリン、クロスリン、フルオロリンク、イミダゾロンなど10種類程度あるが、これら全てのAGE構造がカルボニルストレス産物として病因性を持っているわけではないとも言われている(Kidney International、51巻、1170頁、1997年)。このためAGEに始まるカルボニルストレス原因説がより一層複雑になっている問題があり、糖尿病性合併症に代表される各種血管病変を引き起こすカルボニルストレス産物を選択的、且つ、有効的に吸着できる材料は存在

しなかった。

【0006】

従って、現在このような糖尿病性合併症をはじめとする動脈硬化などの各種血管病変についての治療は有効なものが乏しい。さらに腎症を併発すれば進行程度を弱める治療はあっても、有効な根治的治療手段は皆無に等しく、患者の予後の悪化は加速するために多くの問題を抱えている。現在でも、AGE形成などのカルボニルストレス産物が原因と思われる動脈硬化などの血管病変を罹患した患者の有効な治療手段は希求されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、糖尿病や人工透析など排泄・代謝機能が低下した結果などでカルボニルストレスが病的に亢進した状態で、動脈硬化などの各種血管病変の原因となるカルボニルストレス産物などの糖尿病合併症因子を吸着除去しうる供給可能な吸着体を提供することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記目的を達成するために以下の構成を有する。

「(1)下記受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチド、若しくは、抗体が結合できる糖尿病合併症因子を除去できる物質を水不溶性担体に固定してなる糖尿病合併症因子吸着体。

GAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAQNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWKLNTGRTEAWKVLSPQGGGPW
DSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCRAMNRNGKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELTAGVPNKVGTG
VSEGSYPAGTLSWHLDGKPLVPNEKGVSVKEQTRRH PETGLFTLQSELMVTPARGGDP RPTFSCSFSPGLPR
HRLRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVEPEGGA VAPGGT VTLTCEVPAQPSPQIHW MKDGVPLPLPPSPVLIL
PEIGPDQGTYS CVATHSSHGPQESRAVSIS IIEPGEEGPTAGSVGGSGLGTLALALGILGGLGTAALLIGV
ILWQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQSEEPEAGESSTGGP

(但し、上記配列はN末端からのものであり、アミノ酸は一文字記載のアルファベットで表した。)」

(2) 上記(1)項に記載の糖尿病合併症因子吸着体或いは充填される容器内に被

処理液を接触させることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法。」

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0010】

本発明で言う糖尿病合併症因子吸着体は、水不溶性担体に糖尿病合併症因子と特異的に結合できる物質を固定したものならなんでも良く、特に限定されるものではない。

【0011】

ここで言う糖尿病合併症因子の病因性とは、糖尿病合併症因子と細胞が接触することで、各種サイトカインの誘導、細胞遊走化促進、DNA合成の亢進、接着分子発現亢進、NF- κ Bの活性化による酸化ストレスの誘導などの何れかもしくは複数の現象を引き起こし、結果として、動脈硬化、腎症、網膜症、神経症などの血管病変を引き起こすことを言う。また、糖尿病合併症因子は糖尿病に限定されて見られる増悪因子ではなく、人工透析など排泄・代謝機能の低下の場合にも見られることがある。特に糖尿病患者に多く見られる、血管病変に関わる合併症因子の総称である。

【0012】

糖尿病合併症因子に代表されるカルボニルストレス産物とは、カルボニルストレスを受ける側が必ずしもタンパク質だけではなく、リポタンパク質に代表される脂質関連タンパク質や脂質そのものに由来していても良く、また、タンパク質のような大分子量のものだけではなく、分子量1万以下のペプチド成分やホルモン、核酸などの多糖体由来成分やビタミンなど各種低分子の代謝産物由来であっても良く、場合によっては、アミノ酸そのものや、アミノ酸関連物質、糖関連物質、脂質関連物質等の代謝産物由来であってもよく、糖尿病合併症因子としてカルボニルストレス反応を受けるのであれば、由来はこれらに限定されるものではない。

【0013】

糖尿病合併症因子のうちで、カルボニルストレスなどの非酵素的変性反応を生

み出す反応性物質は、生体中で起こり得るものなら特に限定を受けない。詳しくは、マロンジアルデヒドやグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコゾン等の反応性の高い化合物だけではなく、グルコース、フルクトース、リボースなどの還元糖由来であっても良い。またこれら還元糖が、リン酸エステル化した代謝産物であっても良く、一般的にこれら非酵素的な変性誘導をカルボニルストレスと言うこともある。

【0014】

カルボニルストレスなどの生体中の変性反応を引き起こすものは上記の反応性のあるカルボニル化合物だけではなく、活性酸素、ヒドロキシラジカル、一酸化窒素及びそれら代謝産物などの酸化性能を有するラジカルなどの化合物であっても良く、化合物種はこれ以外であっても良い。特に酸化反応は脂質関連の変性には注目されたが、最近では、糖尿病性合併症で原因といわれる前進性糖化反応にも酸化反応が深く関わっていることが分かってきた。つまり、カルボニルストレス産物に代表される非酵素的変性物質の生成は非常に複雑な反応形態を有している。

【0015】

糖尿病合併症因子としてのカルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質の検出方法について、先にも述べたように、生体内で生成する非酵素的変性物質がすべて病因性を示すわけではないと言われている。そのため、糖尿病合併症因子として生理活性を持つ非酵素的変性物質だけを選択的に除去できることが好ましい。

【0016】

最近、糖尿病合併症因子のうちで非酵素的変性物質の病因性は、主に細胞上のある特殊な受容体と結合することで引き起こされることが分かってきた。その多くは一般的にスカベンジャー受容体と呼ばれるものだが、本来別の機能を有する受容体にカルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質が相互作用することで病因性を引き起こす場合も報告されている。ガレクチン-3、RAGE(Receptor for AGE)などである。特にRAGEは糖尿病の3大合併症である腎症、網膜症、神経症の発症を引き起こすだけではなく、動脈硬化も助長することがわかってきた。最

近になり、動物レベルでRAGEと糖尿病状態で亢進するある特定の物質との相互作用で糖尿病性合併症などの血管障害が引き起こされることが証明されつつある(第42回日本糖尿病学会)。現在、糖尿病合併症因子の病因性を引き出す経路はRAGEが最も重要であると考えられているが、本発明の受容体は特にこれらに限定されるものではない。

【0017】

ごく最近になって、RAGEと相互作用しうる糖尿病合併症因子は、カルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質だけではないことが指摘されるようになった。つまり、糖尿病などカルボニルストレスが病的に亢進する状態でも、RAGEと相互作用しうる糖尿病合併症因子は非酵素的変性物質だけではなく、ある種の炎症マーカーの一群であるS100/カルグラニューリンスーパーファミリーと呼ばれる物質も関わっていることがわかってきた。これらを総称して、EN-RAGE(extracellular newly identified RAGE-binding protein)とも定義される(Cell、97巻、889頁、1999年)。S100/カルグラニューリンスーパーファミリーと呼ばれる物質は血管内皮細胞、単球由来マクロファージやリンパ球などから産生されることが知られている。糖尿病などカルボニルストレスが病的に亢進する状態でも免疫系が亢進していることは指摘されており、その一端に非酵素的変性物質が関与していることが考えられる。

【0018】

また近年になって、糖尿病などの動脈硬化の患者の血液中にはAGEの一群でもあるCMLなどのカルボニルストレス産物に対する抗体価が上昇しているという報告や、透析患者では過酸化脂質などの変性脂質に対する抗体価も亢進していることが知られており、カルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質が抗原提示性を有して、慢性的な炎症を引き起こし、血管障害を助長している可能性も出てきた。その可能性ある経路の一つに、抗原性を有する非酵素的変性物質が血管内皮細胞、単球由来マクロファージやリンパ球などを直接若しくは間接的に刺激して産生されるS100/カルグラニューリンスーパーファミリーと呼ばれる物質が関与していることが挙げられる。また、抗原性を持つAGEは上記以外にも多く報告されており、特に限定を受けない。

【 0 0 1 9 】

つまり、糖尿病合併症因子は、RAGEなどの病因性を引き起こす受容体に直接相互作用できるものか、抗原性を有するなどして免疫系を刺激し、その結果、EN-RAGEと定義される一群の物質の産生を亢進するなどして間接的にRAGEなどの病因性を引き起こす受容体と相互作用するものである。これら糖尿病合併症因子を特異的に除去するには、病因性を引き起こす受容体の糖尿病合併症因子結合活性部分を少なくとも有するものか、抗原性を示すカルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質のエピトープ部分を認識する抗体を結合リガンドとして利用すればよい。

【 0 0 2 0 】

リガンドはタンパク質由来であるために、安価に提供できなければ供給は困難である。現在は、目的とするタンパク質由来のリガンドを遺伝子組み換え或いは細胞工学的な手法を用いて得られることが可能となった。以前は、哺乳動物由来のタンパク質も大腸菌などの細菌を宿主として発現を試みていたが、成功率は必ずしも高くない。特に膜タンパク質や抗体などの大分子量のタンパク質は細菌での産生が特に困難である。特に、膜タンパク質など不溶化等が原因で、一般的に安定大量発現が困難とされるものの場合は、必ずしも膜タンパク質の全配列を発現しなくても必要な活性が得られる手段をとる場合がある。つまり、究極的には糖尿病合併症因子との結合活性を有するドメインだけを選択的に発現すれば良く、場合にもよるが一般論として、このような活性ドメインを構成する最小アミノ酸数は30(ヒトRAGE全配列の7%に相当)から50アミノ酸(ヒトRAGE全配列の12%に相当)とされている。また、糖尿病合併症因子の吸着リガンドとして選んだRAGEについては、ヒト、ウシ、ラット、マウスなどからのクローニングが報告されているが、動物間変異が多少見られる。もともとRAGEはマルチリガンド受容体として同定されており、動物間変異を考慮した受容体アミノ酸配列でも、糖尿病合併症因子との結合活性が維持されるのであれば、吸着リガンドに使用しても良い。この場合の動物間変異は、RAGEと糖尿病合併症因子との結合は細胞外ドメインで行われていることを考慮し、また、リガンドは生体適合性を考慮して、抗原性が極力低いものと考えてヒト由来ものを選んだので、ヒトを基準にして7

4 %以上のアミノ酸配列があっても利用できる。また、発現宿主が大腸菌などの細菌類にするのであれば、発現安定性を考慮して分子量 2 万程度まで落とす必要も要求される場合があり、この場合は糖尿病合併症因子との結合に必要なドメインをもう少し絞り込むことが好ましい。従って、好ましくは、ヒトを基準に 4 0 %以上のアミノ酸配列を有していれば、細菌を宿主にして比較的安定発現が行える糖尿病合併症因子結合活性リガンドが得られる。吸着リガンドを全血処理など抗原提示性を持つと問題がある用途に用いるのであれば、やはりヒト由来のリガンドが無難であるが、RAGEにはこれまで細胞外ドメインのアミノ酸変異にして 4 箇所の報告がある遺伝子多型を持つ受容体であることを考慮しなければならない。この場合、結合活性に必要な細胞外ドメインの全配列を用いたとしてヒトを基準に受容体全配列の 8 4 % (ヒト RAGE の細胞外ドメイン全配列と遺伝子多型の 4 アミノ酸残基を考慮した場合) から 8 5 % (ヒト RAGE の細胞外ドメイン全配列を用いた場合) 以上が維持されていればより好適である。この場合は、発現リガンドの分子量が 2 万を大きく越えてくるのでリガンド発現が困難になってくることがあるが、昆虫細胞を使った遺伝子組み替えで発現が可能となった。

【 0 0 2 1 】

RAGE の全配列かその一部配列が、組み換え体として簡単に単離、精製するために人工配列を遺伝子上に挿入することができる。精製法には他に、RAGE に対する抗体カラムで精製する方法がある。天然アミノ酸で構成される人工配列を挿入すれば精製は簡便である。天然アミノ酸で構成される人工配列には His-Tag や GST や Fc、プロテイン A、プロテイン G などが多く用いられる。また特異なケースでは、あるアミノ酸配列の抗体を利用できる場合には、抗原提示性を有したアミノ酸配列を人工配列として用いる場合もできる。組み換え体に新規の抗原提示性を持たせる場合には、最低 1 アミノ酸を変換すれば良い。この利点としては、天然アミノ酸で構成される人工配列挿入時に注意すべき宿主側組み換え体の folding の影響を最小限に抑えることができ、同時に、溶解度などの組み換え体の物理化学的特性の変化も最小限にできる。天然アミノ酸で構成される人工配列の挿入箇所は、膜タンパク質の場合は一般的に C 末側が良いとされるが、効率的発現や非 in situ 下での正常な folding のためや目的・用途に応じて、N 末側やドメイン内

へ天然アミノ酸で構成される人工配列を挿入することもある。上記以外にも効率の良い天然アミノ酸で構成される人工配列は存在し、目的に応じて有用と思われる天然アミノ酸で構成される人工配列を挿入すれば良く、記載された方法に限定されるものではない。

【 0 0 2 2 】

抗体については、ミエローマを使った細胞融合でモノクローナル抗体が得られるようになった。抗血清やポリクローナル抗体をリガンドに用いる場合はロット間差があるので、できればモノクローナル抗体を用いる方がよい。ただし、糖尿病合併症因子のなかでも非酵素的変性物質はRAGE結合関与や抗原提示に様々な未知な構造も含まれることが予想されるので、検出・評価には抗血清やポリクローナル抗体を用いると精度は落ちるが比較的もれなく検出することが可能となり好ましいと言える。現在、CMLやピラリンに対するモノクローナル抗体が購入可能であり、リガンドに利用可能であるが、この他の非酵素的変性物質に対する抗体はあるので上述した抗体以外でもリガンドに利用できる。また、タンパク質やペプチドなど生体物質で構成されたりリガンド以外にも、化学合成された糖尿病合併症因子吸着リガンドを利用しても良く、特に限定を受けるものではない。

【 0 0 2 3 】

今回用いたリガンドは、抗体についてはポリクローナル抗体と細胞融合技術を使ったモノクローナル抗体であり、膜タンパク質由来成分は昆虫細胞を使った遺伝子組み換え技術を利用して得られたものである。膜タンパク質や発現困難なタンパク質についてもタンパク質の発現方法には現在多くの経済的に有望な方法があるので、特にこれらに限定されなくても良い。

【 0 0 2 4 】

リガンド固定化材料は体外循環も可能でグラフト反応可能な水不溶性担体であり、より好ましくは表面積が多く取れる多孔質体形成可能な材料であり、さらにより好ましくは人工透析などのアフエレーション時の簡便な同時使用を考えて、中空糸加工可能な素材で構成されていればよく、さらに、白血球の刺激を低く抑えられる素材であれば最適であるが、これに限定されるものではない。また、担体は有機-有機、有機-無機の複合担体でも良く、無機担体としてはガラスビーズ

、シリカゲル、金属ビーズなどがあり、有機担体には架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレン、架橋ポリスルホン等の合成高分子や結晶性セルロース、架橋アガロース、架橋デキストランなどの多糖類からなる有機担体との組み合わせでも良い。

【 0 0 2 5 】

担体の形状は、粒状、繊維状またはそれらの高次加工品、中空糸状と任意に形状を選ぶことができ、その大きさも特に限定されない。

【 0 0 2 6 】

リガンドは担体表面上に必ずしも固定化される必要はない場合がある。つまり、体内に溶出することがあっても免疫寛容性のあるリガンドを使えば、体内の変性物質をマスキングして病因性を和らげることが可能となり、体液処理効果も上がることが期待される。

【 0 0 2 7 】

また、ここでのいう体液由来とは、血液、血漿、血清、腹水、リンパ液、関節内液、及びこれらから得られた分画成分、並びにその他の生体由来の液性成分をいう。

【 0 0 2 8 】

リガンドを固定化する場合には、化学的な結合を用いる場合と物理的な結合を用いる場合の二つがある。化学的な結合を用いる場合には、担体表面上に水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、ハロゲン基、サクシニルイミド基、酸無水物基などがあげられるが、必ずしもこれらに限定されるわけではない。また、リガンドは、これら官能基修飾を受けた担体に直接結合してもよいし、何らかのスペーサー分子を介して結合することも可能である。物理的な結合を用いる場合には、リガンド側の酸もしくは塩基性側鎖と正電的結合力で結合する場合と、遷移金属などを介した配位結合を利用する場合がある。リガンドの活性が維持されるのであれば、固定化法は特に限定を受けないし、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 9 】

もし、滅菌時や治療などの使用時にリガンドの脱落が問題になる場合には、共

有結合法により固定化することが好ましい。

【0030】

本発明の吸着体を治療に用いる場合には種々の方法がある。最も簡便な方法としては患者の血液等の体液を体外に導出して血液バッグに貯め、これに本発明の吸着体を混合して変性タンパク質を除去後、フィルターを通して吸着体を除去し、体液を患者に戻す方法がある。

【0031】

次の方法は吸着体をカラムに充填し、体外循環回路に組み込み、オンラインで吸着除去をするものである。処理法には全血を直接還流する方法と血液から血漿を分離してから血漿をカラムに通す方法がある。本発明の吸着体はいずれの方法にも用いることができるが、前述のごとくオンライン処理に最も適している。

【0032】

ここでいう体外循環回路では本発明の吸着体を単独で用いることもできるが、他のアフエレーシス治療にも併用可能である。併用例には、人工透析回路などが挙げられ、透析療法との組み合わせに用いることもできる。

【0033】

【実施例】

実施例 1 : ヒト RAGE 細胞外ドメインのクローニング

ヒト肺 cDNA ライブラリーを鋳型に PCR (polymerase chain reaction) を行い、細胞外領域上流及び下流の 2 つの断片を増幅した。PCR プライマーはヒト RAGE のデータベース配列 (Genebank accession No. M91211) を基に 4 種類設計し、各々 2 種類ずつを上流及び下流増幅プライマーとして用いた。

・上流増幅プライマー: (プライマーの RAGE 中の位置 or 塩基番号 (RAGE の開始コドン ATG の A を 1 とした))

S(1~29) 及び AS(730~749)

・下流増幅プライマー: (プライマーの RAGE 中の位置)

S(462~481) 及び AS(1007~1032)

(上流には制限酵素 EcoRI、下流には BglII の切断部位を付加した。) また、プライマーの安定性と遺伝子発現効率を上げるためにいくつかの塩基は適宜置換した

。さらに、RAGEを可溶型とするため、細胞外ドメインの下流末端に終止コドン(TGA)を付加した。

【 0 0 3 4 】

2種類の反応産物をアガロースゲル電気泳動した。さらに得られた各PCR増幅断片を電気泳動のゲルから回収した後、pUC18ベクターにクローニングし、PCR産物の塩基配列確認を行った。

実施例 2 : バキュロウイルストランスファーベクターへの遺伝子挿入

バキュロウイルスベクターへのクローニングを以下のように行った。ベクターはpVL1393(pharmingen)を用いた。まず、ベクターを制限酵素EcoRIとBglIIで切断し、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化した後精製した。実施例 1 で得たRAGE細胞外領域上流及び下流の2つの断片は以下に示す制限酵素で切断後、目的断片を精製した(目的断片の塩基数)。

- ・ 上流 : EcoRI/FspI (666bp)
- ・ 下流 : FspI/BglII (384bp)

精製した2断片をpVL1393ベクターのポリヘドリンプロモーターの下流に挿入した。得られたクローンについて電気泳動による挿入断片のサイズ確認と塩基配列決定により、目的DNAを持つクローンが構築できたことを確認した。

実施例 3 : His-Tag導入

実施例 2 で得られたRAGEプラスミドDNAを鋳型にPCRを行い、細胞外領域下流末端にHis-Tagを付加した断片を増幅した。PCRプライマーは実施例 1 で用いた下流増幅用プライマーの終止コドンの前にHisをコードするコドン (CAT) の6回繰り返し配列を挿入したものを作製した。

- ・ 増幅プライマー : (プライマーのRAGE中の位置or 塩基番号 (RAGEの開始コドンATGのAを1とした))

S(462~481)及びAS(1007~1032 + (CAT)6 + (TGA)2 + BglII site)

プライマーの安定性と遺伝子発現効率を上げるためにいくつかの塩基は適宜置換した。確認の結果、ヒトRAGE細胞外ドメイン(請求項 1 記載の受容体アミノ酸配列のN末端側から344アミノ酸残基までの配列; 但し最初のアミノ酸をGからMに変更した。)のC末端側にHis-Tagを融合した遺伝子配列を得た。

実施例 4 : 昆虫細胞への感染とヒト RAGE 細胞外ドメインの発現

バキュロウイルスを感染させる昆虫細胞は Sf-9 を用いた。昆虫細胞の培養、ウイルス感染、組み替えタンパク質の発現等については、次の文献を参考に操作を行った(バイオ・インダストリー: BIO INDUSTRY、40 頁、10 巻、1 号、1993 年)。

実施例 5 : ヒト RAGE の精製

実施例 4 で得られたヒト RAGE 細胞外ドメインを含む培養液から目的タンパク質を精製した。精製には、HisTrap(amersham pharmacia)を用いた。溶出バッファで溶出を行わずにそのままカラムを解体してヒト RAGE 結合担体として得た。ヒト RAGE 結合担体の結合量は、溶出量を BCA プロテインアッセイキット(pierce)で測定した結果、約 3.2 mg/ml であった。

実施例 6 : AGE の作成方法

標品の作成には、次の文献(Journal of Biological Chemistry、15 巻、267 (8) 号、5133 頁、1992 年)を参考にした。抗原用にウシ由来リボヌクレアーゼ A (シグマ)を使い、評価用には牛血清アルブミン(BSA)をグルコースを使って 37℃、6 ヶ月間反応させた。途中、pH を 7 以下にならないように 7~7.4 の範囲になるように NaOH で滴定した。反応終了後、PBS で透析して標品を得た。

実施例 7 : AGE 抗体の作成

実施例 6 を参考に NZW (ニュージーランド・ホワイト・ラビット)に対して免疫した。免疫手法は、細胞工学 別冊 抗ペプチド抗体実験プロトコール、48 頁を参考に行った。免疫終了後は、頸部動脈から脱血して、抗血清を得た。得られた抗血清を HiTrap ProteinG カラム(amersham pharmacia)で精製した。得られた抗体は、BSA とはほとんど反応しないが、AGE 化 BSA とは反応した。従って、この抗体は抗原性のある AGE を認識することが示された。

得られた抗血清を使って臨床検体中(血漿)の AGE 量を測定した。測定方法は競合法を用いた。固層化抗原を実施例 6 で得られた AGE 化 BSA を 10 μg/ml、100 μl、2 時間インキュベートで用意した。検量線用の標品も同じく実施例 6 で得られた AGE 化 BSA を用いて、AGE 化 BSA 10 μg/ml の所

を $1 \text{ U} / \text{ml}$ とした。測定には、緩衝液 $25 \mu\text{l}$ 、測定サンプル $25 \mu\text{l}$ 、希釈抗体を $50 \mu\text{l}$ で反応後、固層化抗原を認識した抗体を抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ標識抗体(カップル)で反応後、発色させ評価した。測定結果を以下に示す。

- ・ 健常者 (n=6): $3.92 \pm 1.27 \text{ U} / \text{ml}$
- ・ 糖尿病性腎症患者 (n=10: 透析前採血): $5.72 \pm 0.82 \text{ U} / \text{ml}$

上記結果は、t 検定で有意差があり、得られた抗体は患者血漿中に多く存在する AGE 抗原を認識していることが分かった。

実施例 8 : 抗体の固定化

N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を 10 原子の長さのスペーサーを介して導入したアガロースゲル: アフィゲル 10 (Bio-Rad) 1 ml に実施例 7 で得られたポリクローナル抗体 1.42 mg を 0.1 M HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 1 ml に溶解した溶液を加え、 4°C で一夜ゆっくりと攪拌した。 1 M エタノールアミン塩酸 (pH 8.0) 0.1 ml を加えて、室温で 1.5 時間反応させ、未反応の N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を不活化した後、それぞれ 0.5 M の NaCl を含む 0.1 M 酢酸-NaOH (pH 4.0) 1 ml 及び 0.1 M 炭酸-NaOH (pH 9.0) 1 ml で交互に 3 回洗浄し、最後にリン酸緩衝液にて平衡化を行った。固定化量は残存している量から逆算して、約 $1.31 \text{ mg} / \text{g}$ -ゲルの抗体が固定化された。

実施例 9 : アミドメチル化繊維の生成

50 重量比の海成分 (46 重量比のポリスチレンと 4 重量比のポリプロピレンの混合物) と 50 重量比の島成分 (ポリプロピレン) とからなる米国特許 4661260 記載の海島型複合繊維 (太さ: 2.6 デニール、島の数: 16) を、50 g の N-メチロール- α -クロロアセトアミド、400 g のニトロベンゼン、400 g の 98% 硫酸、0.85 g のパラホルムアルデヒドの混合溶液と 20°C で 1 時間反応させた。その後、繊維をニトロベンゼンで洗浄し、その後、水により反応を停止させた後、メタノールで再び洗浄することにより α -クロロアセトアミドメチル化架橋ポリスチレン繊維 (以下 AMPSt 繊維と略す。) を得た。

実施例 10 : アミドメチル化繊維への抗体の固定化

実施例 9 で得られた AMPSt 繊維をさらに水でよく洗浄し、AMPSt 繊維 (乾燥重量相当で) 0.5 g を得た。実施例 7 で得られた抗 AGE 抗体を脱塩カラムで 0.1 M 重曹水溶液に置換した抗体溶液 1.28 mg / 5 ml と AMPSt 繊維 0.5 g を試験管内で 37℃ で 2 時間ゆっくり振とうしながら反応させた。反応前後の固定化量は吸光度で測定して、0.82 mg / g-繊維の抗体が固定化できた。固定化繊維を 0.1 M エタノールアミン-塩酸 (pH 8.0) 5 ml に交換して、室温で 1.5 時間反応させ、未反応の α クロロアセトアミドメチル基を不活化した後、それぞれ 0.5 M の NaCl を含む 0.1 M 酢酸-NaOH (pH 4.0) 1 ml 及び 0.1 M 炭酸-NaOH (pH 9.0) 1 ml で交互に 3 回洗浄し、最後にリン酸緩衝液にて平衡化を行った。

実施例 11 : 吸着体の AGE 結合試験

実施例 5、8、10 で得られた病因性 AGE 結合性蛋白質固定化担体を使って、吸着実験を行った。形状がゲルの場合は沈降体積で吸着体 100 μ l あたり、サンプル (実施例 6 で得られた AGE 化 BSA 量を 10 μ g / ml 含む 0.5 % BSA-リン酸緩衝液) を 900 μ l 加えた。形状が繊維の場合は、AMPSt 繊維の乾燥重量で 50 μ g あたり、サンプルを 1 ml 加えた。37℃ の孵卵器中で 2 時間ゆっくり振とうした。この反応液を 3000 rpm で 5 分間遠心分離して吸着体を沈降させ、上清中の AGE 量を実施例 7 に記載した免疫学的測定法で測定した。併せて、吸光度法 (280 nm) で全蛋白量の変化を評価した。結果を以下に示す。

【0035】

AGE 吸着率 (%) 全抗体吸着率 (%)

・ ヒト RAGE 固定化ビーズ (実施例 5) :	50.2	2.8
・ 抗 AGE 抗体固定化ビーズ (実施例 8) :	68.3	2.6
・ 抗 AGE 抗体固定化繊維 (実施例 10) :	65.3	8.9

AGE に対して良好な選択性を見せた。RAGE 若しくは抗体を固定化した担体では AGE と良好な親和性を有していたと言える。

比較例 1 : 吸着体の AGE 結合試験 2

実施例 8 で使用したアフィゲル 1 0 を 1 M エタノールアミン塩酸 (pH 8.0) 0.1 ml を加えて、室温で 1.5 時間反応させ、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を不活化した担体と実施例 9 で作成した AMPSt 繊維を用いて実施例 1 1 と同様の操作で AGE に対する吸着実験を行った。

【0036】

	AGE 吸着率 (%)	全タンパク質吸着率 (%)
・ 不活化処理アフィゲル 1 0 :	3.2	2.5
・ AMPSt 繊維 (実施例 9) :	5.3	7.6

結果は、AGE に対する親和性を示さず、糖尿病合併症因子に対して特異的なリガンドを固定化することにより特異的な親和性が生じることが示された。

【0037】

【発明の効果】

本発明の吸着体は、水不溶性担体に糖尿病合併症因子と特異的に結合できる物質を固定してなる糖尿病合併症因子吸着体であり、その糖尿病合併症因子と特異的に結合できる物質の固定方法が、化学結合或いは物理結合を介して水不溶性担体に結合していることを特徴としている。使用した担体の基本構造体は、体外循環療法に使用実績があり、さらに、その糖尿病合併症因子吸着体と被処理液を接触させることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法に関するものであり、糖尿病合併症など非酵素的反応が原因で起こり得る血管障害の治療に極めて有用である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】糖尿病や人工透析など排泄・代謝機能が低下した結果などでカルボニルストレスが病的に亢進した状態で、動脈硬化などの各種血管病変の原因となるカルボニルストレス産物などの糖尿病合併症因子を選択的に吸着除去しうる供給可能な吸着体を提供する。

【解決手段】下記受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチド、若しくは、抗体が結合できる糖尿病合併症因子を特異的に除去できる物質を水不溶性担体に固定してなる糖尿病合併症因子吸着体。

GAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAQNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWKLNTGRTEAWKVLSPQGGGPW
DSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCRAMNRNGKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELTAGVPNKVGTC
VSEGSYPAGTLSWHLDGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPETGLFTLQSELMVTPARGGDPRTFSCSFSPGLPR
HRALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSPQIHWMKDGVPPLPPSPVLIL
PEIGPQDQGTYSVCVATHSSHGPQESRAVSISIIIEPGEEGPTAGSVGGSGLGTLALALGILGGLGTAALLIGV
ILWQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQSEEPEAGESSTGGP

(但し、上記配列はN末端からのものであり、アミノ酸は一文字記載のアルファベットで表した。)

【選択図】なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003159]

1. 変更年月日 1990年 8月29日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
氏 名 東レ株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)